

## **ACERCA DE UNA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA EVITAR LA CLOROSIS FÉRRICA**

J. AGUILAR\*, J. FERNÁNDEZ \*; T. RODRÍGUEZ\*; E. FERNÁNDEZ \* y S. de HARO\*\*

\* Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada.

\*\* Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Almería.

**Abstract:** In this project, we have used different genera of bacteria, *Escherichia coli*, *Bacillus brevis*, *B. subtilis* and *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* and *S. aeruginosa* and *Proteus vulgaris*. In each of these bacteria we studied the formation of crystals of a  $\text{CaCO}_3$  nature, and measured the growth of such crystals throughout a period of time, and finally we have studied the morphology and size of the crystals formed.

From this study we found that the calcium present in solution was transformed into  $\text{CaCO}_3$  crystals of different sizes which are chemically and physiologically inactive so that the addition of the studied bacteria may be a good method to prevent or to eliminate the ferric chlorosis due to the presence of high amounts of  $\text{CaCO}_3$  in the soil solution.

**Key words:** Bacteria. Ferric chlorosis

**Resumen:** En este trabajo, hemos usado diferentes géneros de bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus brevis*, *B. subtilis* y *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* y *S. aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Para cada una de estas bacterias hemos observado la formación natural de cristales de  $\text{CaCO}_3$ , medido el crecimiento de dichos cristales durante un período de tiempo, así como la morfología y el tamaño de los cristales formados.

Del estudio se deduce que el calcio presente en la solución fue transformado en cristales de  $\text{CaCO}_3$  de diferentes tamaños, los cuales son química y fisiológicamente inactivos, por lo que la inoculación de algunas bacterias puede ser un buen método para prevenir o eliminar la clorosis férrica debida a la presencia de grandes cantidades de  $\text{CaCO}_3$  en la solución del suelo.

**Palabras clave:** Bacterias. Clorosis férrica.

### **INTRODUCCIÓN**

La clorosis provocada por una falta de hierro en el suelo es un fenómeno bastante raro (Römheld y Marshner, 1986). Por otra parte no suele aparecer clorosis en suelos ácidos y cuando esto ocurre suele ser por falta de hierro que se corrige fácilmente por aplicación de sales de dicho metal.

El problema se plantea, principalmente en la zona mediterránea, en suelos calcáreos, en los que existe hierro en abundancia pero en forma no asimilable, al ser su solubilidad muy baja, sobre todo cuando son altos los niveles de  $\text{CO}_2$  y consecuentemente de  $\text{HCO}_3^-$  (Loeppert, 1986).

Varias han sido las justificaciones presentadas ante este hecho, así Drouineau (1942)

relaciona la clorosis férrica con la presencia de caliza activa, Yaalon (1957), por su parte, considera un contenido del 10 por 100 de caliza activa como el nivel crítico para los cultivos sensibles. Rostad y St Arnaud (1970) encontraron que el carbonato secundario, acumulado predominantemente como partículas de tamaño limo y arcilla, era la principal causa de clorosis. Más recientemente Campillo y Torrent (1992) hallan una buena correlación entre el contenido relativo de clorofila y la reactividad de los carbonatos a pH 6; mientras que Morris et al. (1990) han expresado que, en algunos casos, la reactividad del  $\text{CaCO}_3$  está más fuertemente relacionada con la intensidad de la clorosis férrica, en algunos cultivos sobre suelos calcáreos, que el contenido en carbonato cálcico equivalente. Finalmente Campillo et al (1992) observan en suelos del sur de España que cuanto menor es el tamaño de partícula mayor es la reactividad de los carbonatos y encuentran cantidades significativas de carbonato en la fracción arcilla fina.

La relativamente baja pluviometría y por tanto el escaso lavado, típico del entorno Mediterráneo del sureste de la Península Ibérica, puede explicar la mayor estabilidad y persistencia de las partículas muy finas de carbonato existentes en el suelo, justificando de esta manera la persistencia y extensión de la clorosis férrica en cosechas producidas en esta zona.

En otro orden de cosas la formación de cristales de carbonato cálcico por bacterias de diferentes géneros ha sido mostrada ampliamente en la literatura, Boquet et al. (1973), Ramos (1975), Aguilar et al. (1978), por lo que opinamos que la conjunción de ambas líneas de pensamiento, es decir la adición de determinadas especies bacterianas a medios muy ricos en calcio, puede originar la formación de grandes cristales de aragonito o calcita, disminuyendo, de forma acusada, la reactividad de los carbonatos y produciendo una clara tendencia a que la clorosis férrica no tenga lugar o se produzca una atenuación de la misma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos seleccionado para esta experiencia los siguientes cultivos bacterianos: *Escherichia coli*, *Bacillus brevis*, *sphaericus*, *subtilis* y *megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* y *aeruginosa* y *Proteus vulgaris*.

El medio usado en todos los cultivos para el estudio de la formación de cristales, contiene los siguientes ingredientes por litro de agua destilada: extracto de levadura (4 g), cloruro cálcico (1,8 g) y agar (6 g). El pH fue ajustado a 8,0 con NaOH y el medio esterilizado a 121°C durante 20 minutos antes de verterlo en grandes cajas Petri, El volumen usado en cada caja Petri fue siempre el mismo (60 ml).

Para el análisis del crecimiento de cristales hemos usado un analizador de imagen Microvideomat Zeiss con un fotomicroscopio incorporado. Los cristales fueron producidos por colonias como indica Ramos (1975) y su identificación fue establecida por difracción de Rayos X y confirmada con el análisis químico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados los vamos a dividir en tres secciones: 1) Sobre la naturaleza de los cristales formados. 2) Acerca de las medidas del crecimiento de cristales. y 3) Acerca de la morfología y tamaño de los cristales.

1) Sobre la naturaleza de los cristales formados: Los diagramas de difracción de rayos-X obtenidos son muy similares y, dentro de esta analogía, el más común, repetido en 14 de las experiencias llevadas a cabo, se presenta en la Tabla 1

La composición química del conjunto de cristales obtenidos es la siguiente:  $\text{CO}_2 = 44.16\%$   $\text{CaO} = 53.22\%$   $\text{MgO} = 2.62\%$

Considerando los resultados anteriores podemos concluir que los cristales están constituidos por aragonito, con una cierta proporción de magnesio que hace que se modifiquen ligeramente las reflexiones correspondientes al aragonito puro.

Tabla 1

<u>D(A)</u>	<u>Intensidades relativas</u>
3.41	100
2.92	8
2.76	11
2.39	55
2.14	12
1.99	42
1.94	4
1.85	16
1.76	38

2) Medida del crecimiento: La medida del crecimiento para los diferentes microorganismos usados podemos observarla en las Figuras 1 a 9, las cuales se han obtenido por la media de las 10 cajas Petri usadas en cada experiencia, aunque en algún caso, debido a problemas de contaminación de las placas se han usado 9 e incluso 8 (*Bacillus brevis* y *Bacillus sphaericus*).

De las citadas figuras se deduce que el ritmo de formación de cristales por cada uno de los microorganismos ensayados, si bien presentan analogías claras, muestran en todos los casos peculiaridades que diferencian a la mayoría de ellos.

La mayor parte de los microorganismos ensayados muestran el inicio de un rápido crecimiento cristalino a los diez días de la siembra, si bien alguno, como el *Micrococcus luteus* lo hace antes, y otros como el *Bacillus brevis* inicia el crecimiento cristalino alrededor de los veinte días.

De los datos obtenidos podemos apreciar que la cantidad de  $\text{CaCO}_3$  formado, está en estrecha relación con la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  existente en el medio, llegando en la mayor parte de los casos a agotar el  $\text{Ca}^{++}$  existente en el medio de cultivo, y en el caso del *B. brevis* hemos observado una disminución en la formación de cristales que parece ser debida a una redisolución de los mismos, que se transforman en geles pero conservando el hábito cristalino,

como podemos observar en la Fotografía 1, lo que puede justificarse por continuar produciéndose  $\text{CO}_2$  y tener lugar entonces la reacción:  
 $\text{CO}_2 + \text{CaCO}_3$  (insoluble) +  $\text{H}_2\text{O}$  <----->  
 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$  (soluble)

En cuanto al tiempo necesario para formar el máximo de cristales, es variable de unos microorganismos a otros, pero, en general, parece estar limitado por las propias condiciones del medio, por lo que las experiencias nunca han superado los 70 días, siendo lo usual entre 40 y 60 días.

3) Morfología y tamaño de los cristales: la formación y crecimiento de los cristales puede tener lugar bien como cristales aislados ( Fotografía 2), bien como cristales agrupados en las colonias como se puede apreciar en la Fotografía 3.

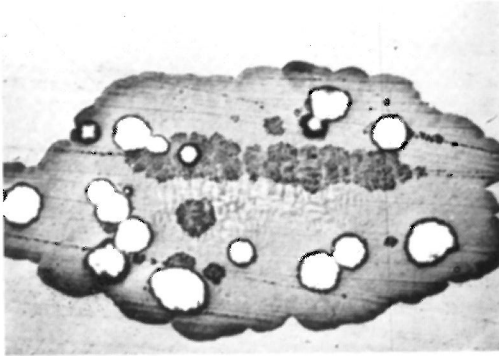
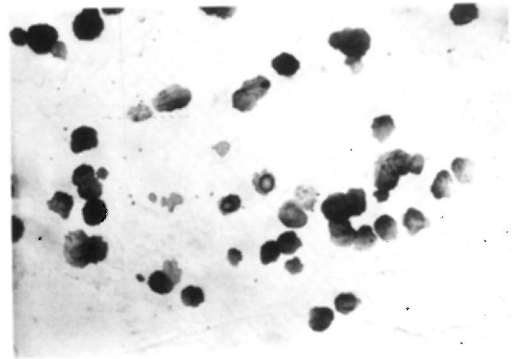
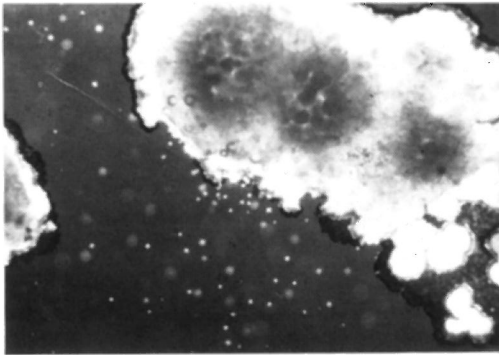
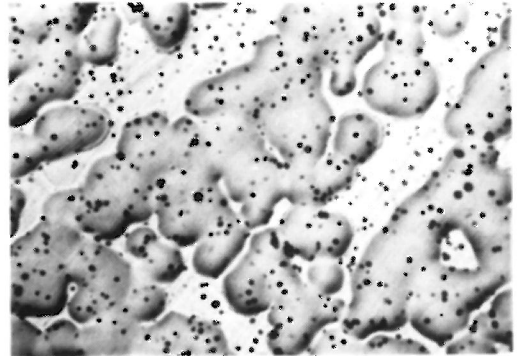
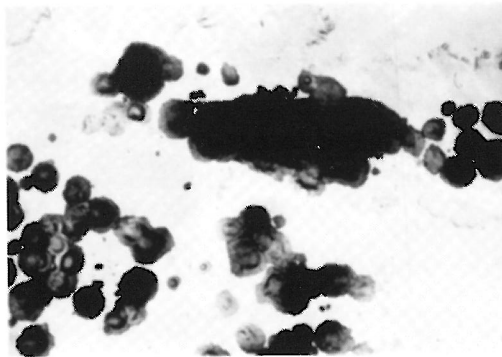
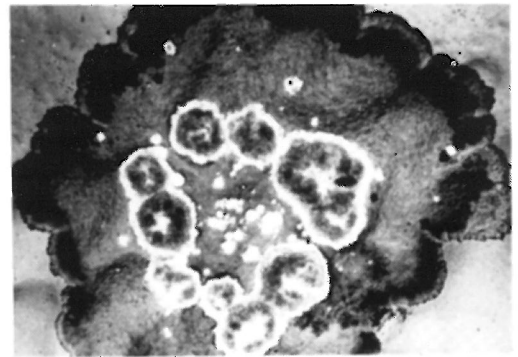
En el caso de crecimiento de cristales aislados se puede reconocer el crecimiento en roseta (Fotografía 4) propio de los cristales de aragonito (Boquet et al., 1973), así como también cristales euhédricos con formas geométricas definidas.

La formación de cristales agrupados, normalmente tiene lugar en el interior de las colonias, aunque en algún caso, como es el de *Escherichia coli* (Fotografía 5), puede tener lugar la aparición de una especie de costra caliza.

El tamaño medio de los cristales se ha determinado a partir de un mínimo de 50 medi-

Tabla 2

Microorganismo	Tamaño (nm) $\phi$ más corto
<i>Bacillus brevis</i>	262
“ <i>sphaericus</i>	214
“ <i>subtilis</i>	231
“ <i>megaterium</i>	242
<i>Escherichia coli</i>	260
<i>Micrococcus luteus</i>	130
<i>Salmonella typhimurium</i>	256
“ <i>aureoginosa</i>	246
<i>Proteus vulgaris</i>	110

Fotografía 1: *Bacillus subtilis*Fotografía 2: Crecimiento de cristales aislados (*Micrococcus luteus*)Fotografía 3: Crecimiento de cristales agrupados en colonias (*Bacillus Brevis*)Fotografía 4: Crecimiento de cristales aislados (*Proteus Vulgaris*)Fotografía 5: Tipo de costra caliza formada por *Bacillus Brevis*

Fotografía 6: Crecimiento en forma de roseta

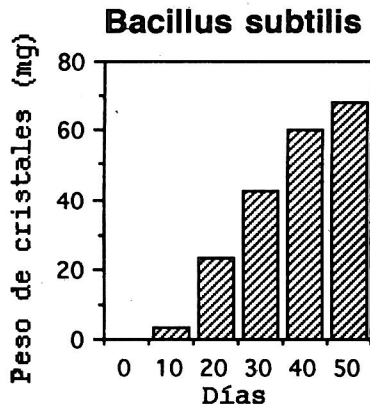


Figura 1

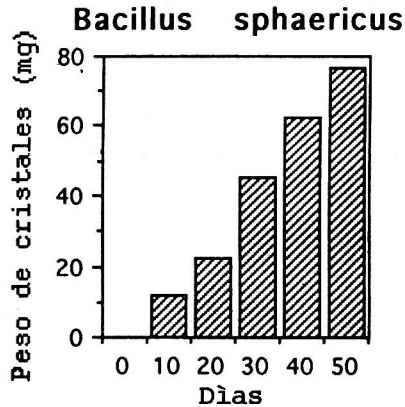


Figura 2

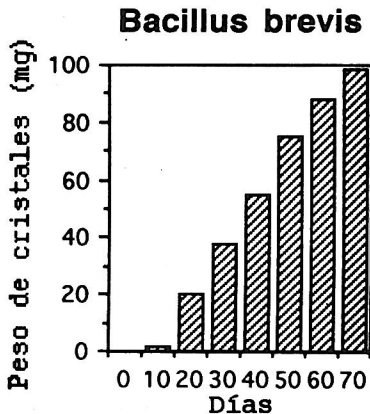


Figura 3

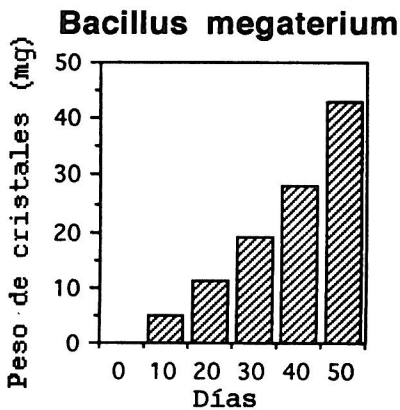


Figura 4

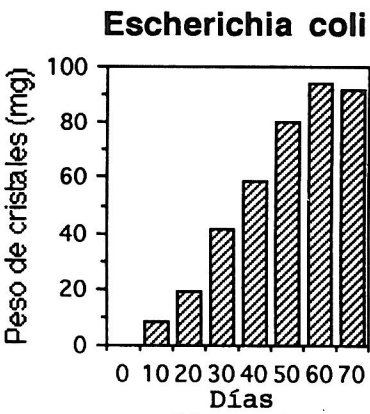


Figura 5

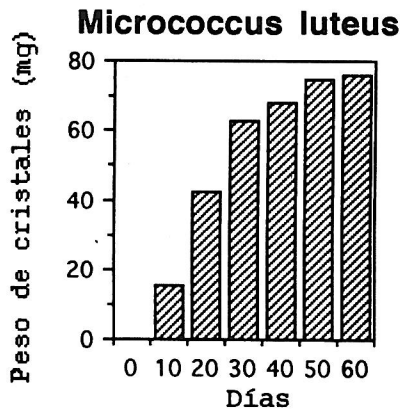


Figura 6

Fig. 1: Las figuras representan la dinámica del crecimiento cristalino con:

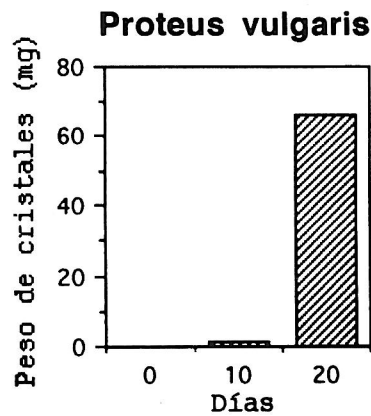


Figura 7

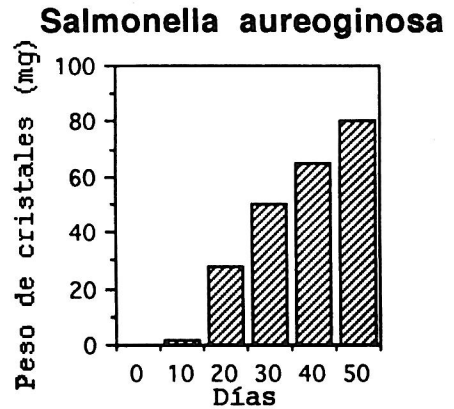


Figura 8

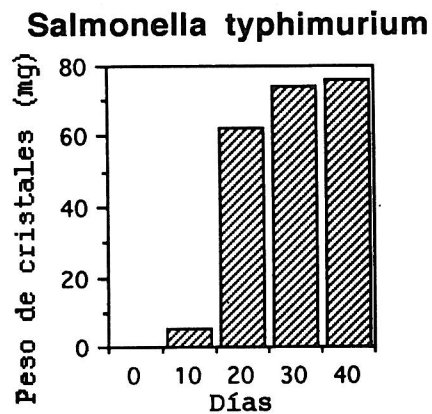


Figura 9

Fig. 1 (Cont.): Las figuras representan la dinámica del crecimiento cristalino con:

das, consignándose el diámetro más corto. Los resultados obtenidos para los distintos microorganismos se presentan en la Tabla 2.

De los resultados anteriores, podemos concluir que la incorporación de determinados microorganismos parece ser un buen método para disminuir la reactividad del calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), ya que se pasa de la existencia de éste en la solución del suelo a la formación de cristales, generalmente del tamaño de arena gruesa, si bien en algunos casos (*Proteus vulgaris* y *Micrococcus luteus*) el tamaño es un poco me-

nor (arena fina), pero que en cualquier caso su reactividad disminuye sensiblemente.

#### REFERENCIAS

- Aguilar, J.; Ramos, A. y Ruiz, F. (1978). "Contribution to the study of the crystals formation process by bacteria". *Micro-morfología de suelos*. Ed. M. Delgado. Granada. 139-168.
- Boquet, E.; Boronat, A. and Ramos, A. (1973).

- “Production of calcite crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 246, 527-529
- Campillo, M.C. and Torrent, J. (1992). “Predicting the incidence of iron chlorosis in calcareous soils of Southern Spain”. *Communication in Soil Science and plant analysis*. 23, 399-416
- Campillo, M.C.; Torrent, J. and Loeppert, R.H. (1992). “The reactivity of carbonate in selected soils of Southern Spain”. *Geoderma*. 52, 149-160.
- Drouineau, G. (1942). “Dossage rapide du calcaire actif du sol: nouvelles données sur la separation et la nature des fractions calcaires”. *Annales Agronomie*, 12, 441-450.
- Loeppert, R.H. (1986). “Reactions of iron and carbonates in calcareous, soils”. *Journal Plant Nutrition*. 9, 195-215.
- Morris, D.R.; Loeppert, R.H. and Moore, T.J. (1990). Indigenous soil factors influencing iron chlorosis of soybean in calcareous soils”. *Soil Science Society American Journal*. 54, 1329-1336.
- Ramos, A. (1975). “Formation of calcite crystals by bacteria of the genus *Bacillus*”. *Microbios*. 13, 61-70.
- Römheld, V. and Marshner, H. (1986). “Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species”. *Advances Plant Nutrition*. 2, 155-204.
- Rostad, H.P.W. and Arnaud, R.J. (1970). “Nature of carbonate mineral in two saskatchewan soils”. *Canadian Journal Soil Science*. 50, 65-70.
- Yaalon, D.H. (1957). “Problems of soil testing on calcareous soils”. *Plant and Soil*. 8, 275-288.